

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-233710

(43) 公開日 平成8年(1996)9月13日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 1/36			G 0 1 N 1/28	Y
B 0 1 L 3/02			B 0 1 L 3/02	Z
C 1 2 M 1/00			C 1 2 M 1/00	A
G 0 1 N 1/00	1 0 1		G 0 1 N 1/00	1 0 1 K
1/28			33/48	T
審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 6 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-36464

(22) 出願日 平成7年(1995)2月24日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(71) 出願人 000005094

日立工機株式会社

東京都千代田区大手町二丁目6番2号

(72) 発明者 藤田 毅

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
社日立製作所基礎研究所内

(72) 発明者 梅村 晋一郎

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会
社日立製作所基礎研究所内

(74) 代理人 弁理士 小川 勝男

最終頁に続く

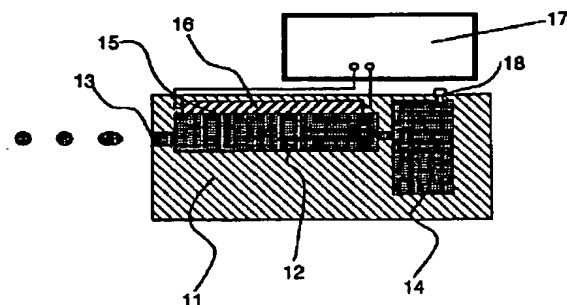
(54) 【発明の名称】 試料調製装置

(57) 【要約】

【目的】 微量反応系を構築し高スループットに反応を実現する方法及び装置を提供すること。

【構成】 検体試料と必要な試薬とを混合して液滴状の反応試料を調製する装置において、0.1nlを越えない量を単位とする液滴生成が可能な分注要素を具備し、前記液滴状の反応試料を構築するために必要な試薬および試料の分注を、最少量1nlを越えない量で、かつ分解能0.1nlを越えない単位で行なう。

図1



【特許請求の範囲】

【請求項1】検体試料と必要な試薬とを混合して液滴状の反応試料を調製する装置において、前記液滴状の反応試料の総容積が $1\mu\text{l}$ を越えないことを特徴とする試料調製装置。

【請求項2】 0.1nl を越えない量を単位とする液滴生成が可能な分注要素を具備し、前記液滴状の反応試料を構築するために必要な試薬および試料の分注を、最少量が 1nl を越えない量で、かつ分解能が 0.1nl を越えない単位で行なう請求項1記載の試料調製装置。

【請求項3】微量液滴を生成する微量分注要素として、液滴化する液体に加速度を与える加速力印加要素と、該加速力印加要素を駆動する駆動および制御回路と、該液体を保持するリザーバと、該加速力印加要素が該液体に力を与えるチャンバと、チャンバから外部大気に連通するノズルと、該リザーバと該チャンバとを結ぶ流路と、該リザーバに該液体を外部から導入するための導入口とを具備し、所定の駆動波形で該加速力印加要素を駆動し、チャンバ内を満たした液体に加速度を与えることにより、ノズルから所定の量の微小液滴を生成し、飛翔せしめる請求項2記載の試料調製装置。

【請求項4】微量液滴下する液体に加速度を与える加速力印加要素として圧電素子、また駆動回路として高周波電流を該圧電素子に印加する回路を具備し、所定の波形の高周波電流を印加された圧電素子が直接、もしくはダイヤモンド等の隔壁要素を介して間接に液体に加速力を印加することによってノズルから所定量の微小液滴を生成し、飛翔せしめるインクジェット方式を利用した請求項3記載の試料調製装置。

【請求項5】微量液滴下する液体に加速度を与える加速力印加要素として磁歪アクチュエータ、また駆動回路として高周波電流を該磁歪アクチュエータに印加する回路を具備し、所定の波形の高周波電流を印加された磁歪アクチュエータが直接、もしくはダイヤモンド等の隔壁要素を介して間接に液体に加速力を印加することによってノズルから所定量の微小液滴を生成し、飛翔せしめるインクジェット方式を利用した請求項3記載の試料調製装置。

【請求項6】微量液滴下する液体に加速度を与える加速力印加要素として、チャンバ内の液体に局部的に熱を与える発熱体と、該発熱体を制御する制御要素とを具備し、局部的に与えられた熱によってチャンバ内の液体中で急速に成長する気泡の体積変化により、ノズル近傍の液体に加速度を発生させ、ノズルから所定量の微小液滴を生成し、飛翔せしめるバブルジェット方式を利用した請求項3記載の試料調製装置。

【請求項7】一組の加速力印加要素、駆動回路、制御回路、リザーバ、チャンバ、流路、ノズルおよび導入口から構成される独立した液滴生成装置が、複数組並列に配列されていて、かつ各々の液滴生成装置を統合的に制御

する上位制御回路を具備し、反応試料液の構築に繰り返して使用される一つまたは複数種類の試薬を各々の液滴生成装置の試薬チャンバおよびリザーバに保持し、前記上位制御回路により、予め決められたプログラムに添って必要なタイミングで必要な液滴生成装置を駆動して試薬を分注することによって反応試料を構築する請求項3記載の試料調製装置。

【請求項8】液滴生成装置と、液滴生成装置から打ち出される液滴を受け入れて反応試料を保持する一つ又は複数の反応孔を有する反応容器を具備し、液滴生成装置もしくは反応容器の少なくともどちらか一方に備えられた自らの位置を制御する位置制御要素により、該液滴生成装置と該反応孔との相対位置関係を制御し変化させながら分注を行なうことにより、所定の反応孔に所定の試料もしくは試薬が分注される請求項7記載の試料調製装置。

【請求項9】試薬としてPCR (Polymerase Chain Reaction) パッファなどの反応パッファ液、DNA合成に必要な複数種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸、PCRを行なう場合に一つまたは複数種類の増幅領域に対応する所定の2種類以上のオリゴヌクレオチドプライマ、Taqポリメラーゼ等の酵素とを各々の液滴生成装置に保持し、独立に制御された液滴生成装置で所定の反応孔に所定の試薬を分注する請求項7記載の試料調製装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は遺伝子解析のための生化学反応処理装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】医療分野、臨床検査分野、バイオテクノロジー分野において取り扱う液体試料は、それらが貴重なものであったり、本質的に少量しか存在しない場合が多い。また医療検査時の侵襲性の軽減や、環境安全への考慮の立場から、検査試料や試薬の微量化が強く望まれている。

【0003】このような背景の中で微量反応液中での生化学反応処理を行なう際の微量ハンドリング技術が必要となってくる。従来、微量液体試料の計量、ハンドリング技術としては、キャピラリ、シリンジ、市販のマイクロ液滴生成装置（以下液滴生成装置をビベッタと略称する）等による吸引、吐出が挙げられるが、最少取り扱い量はせいぜい $0.5\mu\text{l}$ が限度であった。またこの量の精度に関しても液体の粘性や表面張力によるビベッタ先端等への試料の付着が原因となって、正確なハンドリングは極めて困難であった。

【0004】一方、特に医療分野や臨床検査分野においては、近年検査量が飛躍的に増え、前処理の高速化・高スループット化が強く望まれている。しかし従来の技術では、最少ハンドリング量に応じて構築される反応試料

液の総量が決まり、結果として反応試料液の総量が10 μ l~100 μ lと多くなるので、重要な反応プロセスである反応液の温度制御に必要な時間が長くなり、反応処理全体の高スループット化が困難でもあった。図6、7に示すグラフは種々の量の試料液滴をステップ応答的に昇温した場合の試料液滴の中心温度履歴（図6）、および中心と熱媒体から最も遠い液滴表面との内部温度差（図7）を計算したものである。これらのグラフから考えるに、例えばPCR（Polymerase Chain Reaction）で必要とする約20℃の反応液温度変化を10秒以下で実現し（追従誤差=0.5℃（図6中矢印））、さらに上記の10秒以内の時間スケールの中で目標温度と最も温度追従の遅い領域の到達温度との差（追従誤差+内部温度差=0.5℃+0.4℃（図7中矢印））を1℃以下に抑えるためには、反応液の総量が1 μ l以下の量である必要がある。加えて反応液の温度制御を最小限の時間で正確に行なうためには、反応液の熱容量を正確に見積る必要があるが、これは即ち分注の精度によって決まるので、温度制御の高速化を考える上でも分注精度は非常に重要な問題である。

【0005】また生化学反応処理では複数種類の試薬を、検体試料とともに適宜混合し反応することが必要であるが、従来のピペッタやシリンジといった移送分注機構では、分注毎に吸引・吐出動作を繰り返す必要があったり、吸引場所から吐出場所への移動距離や一回の吸引もしくは吐出動作が大きいなどの理由で、多種類かつ多数の試薬を所定の反応容器に対して高速に分注するのは極めて困難であった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、液体試料の最少ハンドリング量を従来の方法に比べて2桁以上小さくすることを目的とする。またハンドリング量の微量化により反応試料の総量を従来の方法に比べて2桁以上小さくし、これにより反応総時間を短縮し高スループット化を実現するものである。

【0007】さらに、本発明は多数種類の試薬を予め決められた複数の反応容器に対して高速に分注する装置を提供するものである。

【0008】

【課題を解決するための手段】高周波の加速力を試料に印加し、高速度で試料液体を打ち出すことにより極微量の液滴形成を可能とするピペッタを構築し、このピペッタを複数個二次元平面上に配列したピペッタアレイを構築することによって上記の課題を解決した。

【0009】

【作用】上記記載の高加速力を利用したピペッタを構築することにより、最少1nlの微量ハンドリングを、0.1nl単位の分解能で分注することが可能となった。微量液滴は液量0.1nl、生成誤差 $\pm 5\%$ 未満のものが生成可能で、これを繰り返し打ち出すことにより

所定量の分注を行なう。打ち出しパルス数は電子制御により極めて正確に行なうことが可能なので、分注誤差全体としても $\pm 5\%$ 未満を実現する。

【0010】またこのことにより、総量が1 μ lを越えない反応試料の系を構築することが可能となった。生化学反応には反応試料液の温度調節が不可欠であるが、反応液の微量化が進み1 μ l以下の反応系を構築することが可能となったので、反応液の体積/表面積比が小さくなり、昇温速度が3℃/sec以上で反応液内での温度分布が $\Delta 1^\circ\text{C}$ 以下と、高速かつ良好な反応条件を実現することができる。

【0011】また該方式のピペッタは加速力を駆動する高周波の周波数に応じて分注速度も高くできる。例えば10kHzで駆動した場合には、1反応試料の構築（最大1 μ l）当たり1秒程度で実現可能となった。これにより100サンプル/1分~2分という高速度で反応試料の構築が可能である。

【0012】さらに該方式を採用することにより、ピペッタの複数配列（アレイ）化が可能となった。即ち該方式ピペッタにおいては、チャンバ、リザーバ、駆動要素が小型であり、駆動機構も駆動要素である圧電素子に電圧を印加するだけであるので、制御機構も単純で、独立に複数の駆動要素を容易に駆動可能である。アレイ化したピペッタを適当な移動要素に装着し、複数の反応孔を平面上に配置した反応容器との相対位置を適宜変化させながら、必要なタイミングで必要なピペッタ部の駆動要素（圧電素子）を駆動することにより、ちょうどインクジェット式プリンタが描画するように目的位置の反応孔に対して目的試薬の分注が高スループットに実現可能となった。

【0013】さらに、これらの独立の液滴生成装置を、複数個並列にまたはさらにこれを複数組多段に配列した場合に、各々の液滴生成装置を統合的に制御する上位制御回路を具備し、反応試料液の構築に繰り返し使用される一つまたは複数種類の試薬を各々の液滴生成装置の試薬チャンバおよびリザーバに保持し、前記上位制御回路により、予め決められたプログラムに添って必要なタイミングで必要な液滴生成装置を駆動して試薬を分注することによって、トータルの操作性に優れた液滴生成装置が構築できる。

【0014】

【実施例】以下に本発明の実施例を示す。

【0015】図1、図2は本発明の一実施例として実現したインクジェット式ナノピペッタの概略図であり、図1に主要部を断面で示す構成図、図2にノズル正面から見た本体の図を示す。

【0016】ピペッタフレーム11内に形成されるピペッタチャンバ12、大気に連通し液滴が生成され打ち出されるノズル13、リザーバ14、該ピペッタチャンバ12に対してダイヤフラム15を介して駆動力を印加す

る圧電素子16、圧電素子を制御する制御装置17、およびリザーバ14に試薬もしくは試料を導入する導入口18からなる。

【0017】図1は本実施例のインクジェット式ナノビベッタの一要素の断面図であって、これをノズル13の正面側から見ると、図2に示すように、複数のビベッタが並列に配列されたものとなっている。本実施例では32個のビベッタをアレイ化したのが、本発明はこれに制限されるものでなく必要に応じて配列を決めればよい。場合によっては、縦横二次元に配列することも可能である。

【0018】チャンバ12およびリザーバ14を試薬もしくは試料で満たし、試料液体の表面張力や粘性などの物性やビベッタ構造によって決まる所定の駆動波形で圧電素子16を駆動することにより、ノズル13から所定の量の微小液滴が生成され打ち出される。生成される液滴の量は試料液体の物性や駆動波形によって異なるが、予め該パラメータの値によって算出もしくは実験的に求ることができる。

【0019】本実施例においては蒸留水（もしくは蒸留水に準じた物性を持つ試料）に関しては0.1n1、50%グリセロールおよび微量（0.01%）の非イオン性界面活性剤を含む酵素溶液に関しては0.01n1の液滴が±5%未満の誤差範囲で再現性良く生成された。

【0020】図3は本発明のインクジェット式ビベッタを応用した生化学反応装置の分注要素を示す。装置は、図1、2で示したビベッタアレイ31、ビベッタアレイの位置を制御するビベッタ移動要素32、液滴を受け入れ反応を行なう反応容器33、および反応容器の位置を制御する反応容器移動要素34からなる。反応容器33は複数の反応孔が配列されたマイクロタイタープレートである。

【0021】ビベッタ移動要素32および反応容器移動要素34は制御装置17によって制御され、予めプログラムされたプロトコルに従って相対位置を変化させられる。実施例においては、ビベッタアレイが水平方向に試薬液滴を打ち出し、反応容器が45度の角度で液滴を受け入れているが、本発明はこれに制限されるものでなく、打ち出しと受け入れが成立するあらゆる関係にビベッタと反応容器が配置されるものとしてもよい。例えば、水平面内に反応孔が配列される反応容器に対して、その垂直方向上方からビベッタが液滴を打ち出す場合である。

【0022】また図4は反応容器中のマイクロタイタープレート43の拡大図である。反応孔41の底面は、図のように半球面をなし、受け入れた液滴42が表面張力でまとまり易い構造になっている。さらに半球面の半径は0.7mmと1μlの液滴42と良く曲率が一致し、反応孔と試料液42との熱的接触の効率が高くなる構造

となっている。ちなみに図4において、42は分注した試料液、44は該試料液の上層に導入した試料液蒸発防止用のミネラルオイルである。

【0023】反応容器の底面は非常に薄くかつ熱電導率に優れた材質43で構成されており、反応液を構築した後、図5に示すように、所定の反応温度に制御された熱媒体51と反応容器底面を順次接触させるように制御することにより、またもしくは、所定の温度に制御された高温もしくは低温のエアを吹き付けるなどの手法により、反応液温度をステップ応答に近い速度またはそれ以上の速度で変化させることが可能である。

【0024】次に本発明を用いて行なった遺伝子試料調製処理の一例について述べる。

【0025】本実施例ではヒト血球細胞より抽出したゲノムDNAから、HLA（ヒト白血球抗原）遺伝子のクラス2領域に関してPCR-SSCP（Single-Strand-Conformation-Polymorphism）法により遺伝子タイピングを行なった。

【0026】常法により、ゲノムDNAを抽出したDNA試料溶液（6検体分）、10mM Tris-HCl（pH8.3）、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.02% グラチン、各200μM デオキシリボヌクレオチド三リン酸（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）を含むPCRバッファ液、Taqポリメラーゼ溶液、解析を行なうHLAのDQA1、DQB1、DR1、DR2、DR3（およびDR5、6、8）、DR4、DR7、DR9、DR10、DR52-1、DR52-2、DPA1、DPB1領域に対応する16種類の5μMローダミンX-蛍光標識オリゴヌクレオチドプライマ溶液（M Bannai等 European Journal of Immunogenetics 1994 21巻 1号 p1~9、および木村等 蛋白質 核酸 酵素 35巻 17号 p3091~3103）、ミネラルオイルを各々の試薬チャンバに保持し、16反応孔×6検体（DNA試料溶液）を1~10ng程度、全ての反応孔にPCRバッファ液を900n1、全ての反応孔にTaqポリメラーゼ溶液を0.15U、所定の反応孔に所定の2種類のプライマを40n1ずつ、およびミネラルオイル2μlを、ビベッタ31および反応容器33を移動しながら順次所定の圧電素子を駆動し分注した。この分注に必要な時間は約5分であった。

【0027】この後、反応容器をステップ応答的に温度制御しPCRサイクルを94℃（10秒）→57℃（10秒）→72℃（30秒）で30サイクル行ない、反応を終了した。PCRサイクルに要した時間は30分であった。

【0028】この反応産物全量をSSCP電気泳動に持ち込んで解析した結果、6検体全てについて電気泳動パ

タンは十分な感度と分離を示し、HLAクラス2領域の遺伝子タイピングが可能であった。

【0029】本発明によれば、従来の標準的な通常の手操作で行なう場合のPCR反応液の構築に2時間、反応に3.5時間要する作業を、わずか40分弱で完了することができた。

【0030】本実施例においては分注装置として、インクジェット方式を利用したものに限って記載を行なったが、本発明はこれに制限を受けるものではなく、微量反応試料を構築し高スループットに反応を実現する方法および装置を提供することが本発明の主旨である。

【0031】

【発明の効果】本発明によって液体試料の最少ハンドリング量を従来の方法に比べて2桁以上小さくすることができた。またハンドリング量の微量化により一つの反応試料の総量を従来の方法に比べて2桁以上小さくし、その結果反応総時間を1/7以下に短縮することができた。

【0032】さらに本発明は多数種類の試薬を予め決められた複数の反応容器に対して高速に分注する装置を提供するものであり、これにより高スループットな試料調製装置を実現した。

*【図面の簡単な説明】

【図1】実施例のインクジェット式ナノピペッタの主要部を断面図で示す概略図。

【図2】実施例のアレイ化したインクジェット式ナノピペッタの正面図。

【図3】インクジェット式ナノピペッタおよび反応容器を組み合わせた遺伝子解析装置の概略図。

【図4】本実施例で用いた反応容器の拡大図。

【図5】本実施例で用いた反応容器、温度調節装置および反応容器移動要素の概略図。

【図6】種々の量の試料液滴をステップ応答的に昇温した場合の試料液滴の中心温度履歴の計算例を示す図。

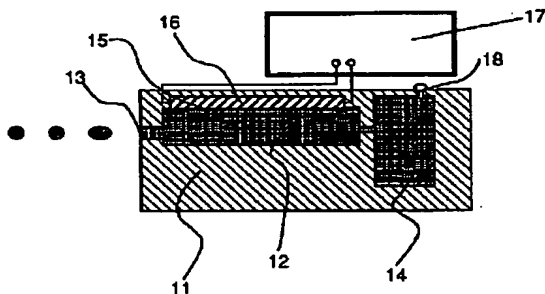
【図7】試料液滴の中心と熱媒体から最も遠い液滴表面との内部温度差の例を計算した図。

【符号の説明】

11…ピペッタフレーム、12…チャンバ、13…ノズル、14…リザーバ、15…ダイヤフラム、16…圧電素子、17…制御装置、18…導入口、31…ピペッタアレイ、32…ピペッタ移動要素、33…反応容器、34…反応容器移動要素、41…反応孔、42…試料液、43…マイクロタイタープレート、44…ミネラルオイル、51…熱媒体、52…熱絶縁体。

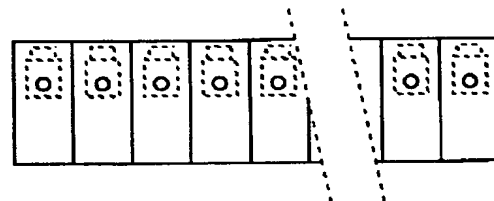
【図1】

図1



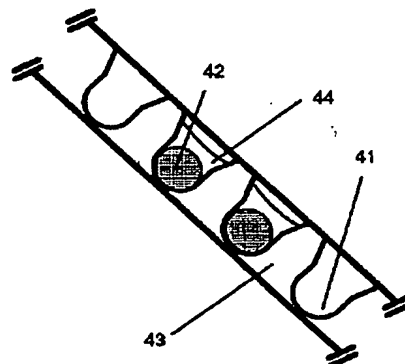
【図2】

図2



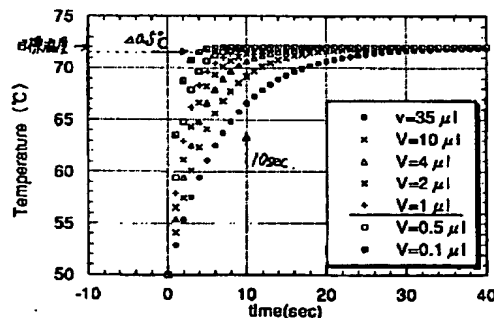
【図4】

図4



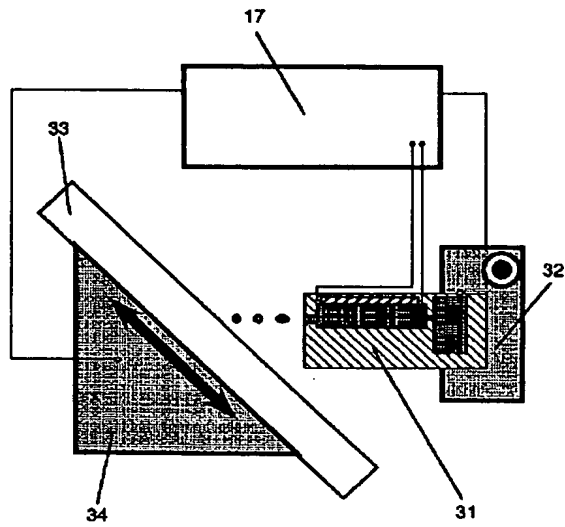
【図6】

図6



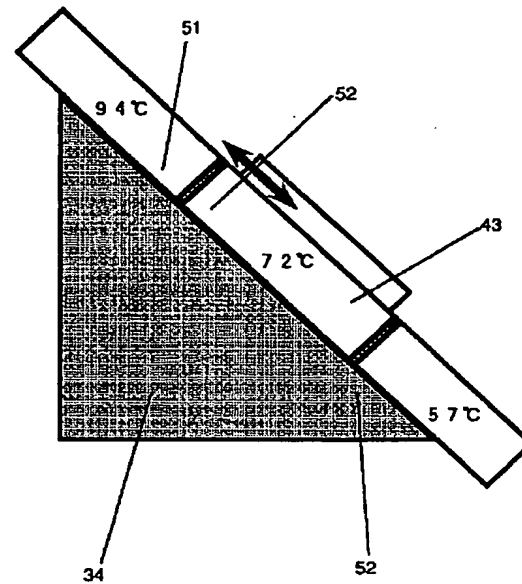
【図3】

図3



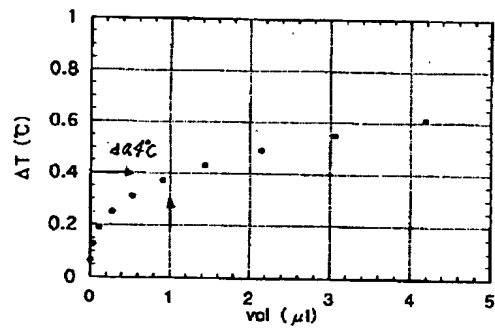
【図5】

図5



【図7】

図7



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁸
G 0 1 N 33/48

識別記号 庁内整理番号

F I
G 0 1 N 1/28

技術表示箇所
K

(72)発明者 永田 純
東京都千代田区大手町二丁目6番2号 日
立工機株式会社内